

## METHOD FOR MEASURING OXIDATIVE DNA DAMAGED PRODUCT

**Patent number:** JP2000310625  
**Publication date:** 2000-11-07  
**Inventor:** KASAI HIROSHI  
**Applicant:** SUMITOMO PHARMA  
**Classification:**  
- International: **C12Q1/68; G01N30/44; G01N30/46; G01N30/80; G01N30/88; G01N33/493; G01N33/50; C12Q1/68; G01N30/00; G01N33/487; G01N33/50; (IPC1-7): G01N30/88; C12Q1/68; G01N30/44; G01N30/46; G01N30/48; G01N30/80; G01N33/493; G01N33/50**  
- european:  
**Application number:** JP19990121352 19990428  
**Priority number(s):** JP19990121352 19990428

Report a data error here

### Abstract of JP2000310625

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To accurately grasp to what active oxygen an organism is actually exposed to by passing urine through a gel filtration column for fractionation, passing a fraction through an inverse-phase column, and measuring the amount of an oxidative DNA damaged product or a carcinogen-DNA adduct in an eluate from the inverse-phase column. **SOLUTION:** Urine is passed through a gel filtration column (multi-mode column) with the characteristics of an inverse-phase column and an ion-exchange column for fractionation to obtain a fraction containing an oxidative DNA damaged product or a carcinogen-DNA adduct. As a separation mode, an inverse-phase mode, an ion-exchange mode, and a gel filtration mode simultaneously operate for separation. In the inverse-phase mode, operation is made by using polyvinyl alcohol as a support material. Also, for operating the ion-exchange mode, a carboxyl group is contained in the solid phase of the support material of the multi-mode column. By using the multi-mode column, salt content, protein, and low-molecule impurities in the urine can be simultaneously eliminated.

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 ( J P )

(12) 公開特許公報 ( A )

(11) 特許出願公開番号

特開2000-310625

( P 2 0 0 0 - 3 1 0 6 2 5 A )

(43) 公開日 平成12年11月7日 (2000. 11. 7)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターマコード <sup>*</sup> (参考)
G01N 30/88		G01N 30/88	E 2G045
C12Q 1/68		C12Q 1/68	Z 4B063
G01N 30/44		G01N 30/44	
30/46		30/46	A
30/48		30/48	P

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-121352

(22) 出願日 平成11年4月28日 (1999. 4. 28)

(71) 出願人 000183370

住友製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号

(72) 発明者 葛西 宏

北九州市八幡西区光貞台2-25-5

(74) 代理人 100107629

弁理士 中村 敏夫

Fターム(参考) 2G045 AA16 BB06 BB12 CB03 DA12

DA13 DA78 FB06

4B063 QA01 QA19 QQ03 QQ42 QQ61

QQ62 QR90 QS13 QS15 QS17

QS39 QX01

(54) 【発明の名称】 酸化的DNA損傷産物の測定方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明の目的は、尿中に存在するDNA酸化的損傷によって産生された酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体（アダクト）の高感度且つ簡便な測定方法を提供することにある。

【解決手段】 以下の順の工程からなる、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の尿中濃度の測定方法。

1) 逆相カラムおよびイオン交換カラムの特性を併せ持つゲルろ過カラムに尿を通して分画し、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体を含む画分を得る工程。

2) 該画分を逆相カラムに通す工程。

3) 該逆相カラムからの溶離液中の酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の量を測定する工程。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の順の工程からなる、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の尿中濃度の測定方法。

1) 逆相カラムおよびイオン交換カラムの特性を併せ持つゲルろ過カラムに尿を通して分画し、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体を含む画分を得る工程。

2) 該画分を逆相カラムに通す工程。

3) 該逆相カラムからの溶離液中の酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の量を測定する工程。

【請求項2】 酸化的DNA損傷産物の尿中濃度を測定する請求項1記載の測定方法。

【請求項3】 酸化的DNA損傷産物が、酸化的損傷ヌクレオシドおよび/または酸化的損傷塩基である請求項2記載の測定方法。

【請求項4】 酸化的損傷ヌクレオシドが8-ヒドロキシデオキシグアノシンであり、酸化的損傷塩基が8-ヒドロキシグアニンである請求項3記載の測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体（アダクト）の尿中濃度の測定方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、生体内での活性酸素（酸素ラジカル）の作用が注目され、様々な疾患や老化の原因としての関与を示唆する幾つかの事実が知られている。即ち、1) 発癌因子である放射線は活性酸素の発生を引き起こし、その結果DNA損傷を起こし、2) 動物の自然発生癌の頻度はその動物種の酸素消費量と相関関係があり、3) 発癌物質や発癌プロモーターの多くが活性酸素を発生する等である。上記のように活性酸素がヒト癌の発生に密接に関与するとすれば、何らかの手段で証明することにより、アンチオキシダント（いわゆるラジカルスカベンジャー）の摂取等、癌の発生を抑制する癌予防対策の為の有効な戦略を編み出すことも可能になると考えられる。活性酸素の発生は、上記の如く酸素代謝、化学発癌物質及び放射線によって発生するが、炎症において重要なアラキドン酸カスケード等の代謝系やアポトーシスにおいても重要な働きを示している。

【0003】この様に、生体内で種々な働きを示す活性酸素の発生が、発癌過程に関与していることは容易に推測できるが、活性酸素そのものは不安定であり細胞内で直接検出することは困難であるのが現状である。現時点で最も重要なことはヒト発癌過程において活性酸素が実際に関与している直接の証拠を多く見つけることであるが、その場合には簡便に且つ容易に活性酸素を直接または間接的に測定する方法の確立が要求されている。

【0004】活性酸素によるDNA損傷産物、8-ヒド

ロキシグアニン（以下、8-OH-Guaともいう）は、1984年に葛西等によって発見された酸化的DNA損傷マーカーの一つであり、アデニンとの塩基対形成によりG・C→T・Aトランスバージョン突然変異を引き起こすことが知られており、発癌過程で重要な役割を演じていると思われる。

【0005】現在、8-ヒドロキシデオキシグアノシン（以下、8-OH-dGともいう）は酸化的DNA損傷のマーカーとして広く用いられており、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）に接続した電気化学検出器（ECD）によって測定される（HPLC-ECD法）。

【0006】8-OH-dGの測定は、臓器や培養細胞及び末梢血白血球等の血液由来細胞を用いて測定することが可能であるが、尿中の量を測定することも試みられている（Kasai et al., Mutation Res., 387, 147-163, 1997）。

個人個人の発癌リスク評価、活性酸素関連疾患の診断、老化度の評価のための指標として8-OH-dGを測定するためには尿中の量を測定することが簡便であり、また実用的である。これまでに報告されている尿中8-OH-dGの分析法は大きく分けて3種知られている。1) 8-OH-dGに対する抗体を結合させたアフィニティーカラムで精製した分画をHPLC-ECD法で分析する（Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3375-3379, 1992）。

2) 3本のカラムを接続し、カラムスイッチングにより8-OH-dGを分離し、電気化学検出器（ECD）により検出する（Loft et al., Carcinogenesis, 13, 2241-2247, 1992）。3) ELISA法により尿を直接分析する（Erhola et al., FEBS Lett., 9, 287-291, 1997）。

【0007】しかしながら、各々の方法にはそれぞれ問題点がある。1) の方法は、アフィニティーカラムが市販されていないため、一般的に用いることができない。また、回収率が低く放射性の内部標準物質を使って尿中濃度を計算する必要がある。2) の方法では、前処理が複雑で回収率についても不明確である。また、8-OH-dGのピーク付近に夾雑物が出る場合が多く、研究室により測定値がかなり異なる。3) の方法は、特異性に問題があり、HPLC-ECD法より8倍高い値で測定値が報告されており、しかもデータのばらつきが大きい（Prieme et al., Natural antioxidants and food quality in atherosclerosis and cancer prevention (Kumpulainen et al., eds.), The Royal Society of Chemistry, pp78-82, 1996）。

【0008】さらに、上記の1)、3)の方法は、抗体を利用したカラムやELISAによる検出方法であるため、8-OH-dG以外の酸化的損傷ヌクレオシドを測定することはできない。また、2)の方法は、8-OH-dGは測定できるものの、8-OH-dGを修復して産生される8-OH-Guaを測定することはできない。尿中には、8-OH-dG以外にも多種多様の酸化的損傷ヌクレオシドが存在する。また、発癌リスクをモニターするための発癌物質-DNA付加体

(アダクト)が存在する可能性がある。しかしながら、従来の方法はこれらの微量な物質を検出することはできない。

【0009】また、抗体アフィニティーカラムを用いた8-OH-dGと8-OH-Guaの同時分析が一例のみ報告されている(Park et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3375-3379, 1992)。しかし回収率が悪く、尿に放射性同位元素<sup>14</sup>Cを用いて標識した内部標準物質を混合して、同位体希釈法による尿中濃度を計算している。また、抗体を結合しているアフィニティーカラムが市販されておらず、抗体カラムの作製方法によって8-OH-dGと8-OH-Guaの結合能力が変わるため、本方法は簡便性及び再現性に欠ける点で一般的な方法とはなり難い。

【0010】8-OH-dG以外にも2-ヒドロキシデオキシアデノシン(2-OH-dA)、5-ヒドロキシデオキシシチジン(5-OH-dC)、5-ホルミルデオキシウリジン(5-HO-dU)等、数10種類の酸化的DNA損傷の存在が知られているが、生体試料における分析はなされていない。

#### 【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、尿中に存在するDNA酸化的損傷によって産生された酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体(アダクト)の高感度且つ簡便な測定方法を提供することにある。

#### 【0012】

【課題を解決するための手段】本発明者は、尿中に存在する多種多様の酸化的DNA損傷産物および発癌リスクをモニターするための発癌物質-DNA付加体(アダクト)を検出する高感度且つ簡便な測定方法を確立するため、2種のカラムを順次使用することによって尿試料を直接精製し、尿中の不純物を除去し、電気化学検出器(ECD)等で測定した。

【0013】即ち、本発明の要旨は、次のとおりである。

(1) 以下の順の工程からなる、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の尿中濃度の測定方法。

1) 逆相カラムおよびイオン交換カラムの特性を併せ持つゲルろ過カラムに尿を通して分画し、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体を含む画分を得る工程。

2) 該画分を逆相カラムに通す工程。

3) 該逆相カラムからの溶離液中の酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の量を測定する工程。

(2) 酸化的DNA損傷産物の尿中濃度を測定する上記(1)記載の測定方法。

(3) 酸化的DNA損傷産物が、酸化的損傷ヌクレオシドおよび/または酸化的損傷塩基である上記(2)記載の測定方法。

(4) 酸化的損傷ヌクレオシドが8-ヒドロキシデオキシグアノシンであり、酸化的損傷塩基が8-ヒドロキ

シグアニンである上記(3)記載の測定方法。

#### 【0014】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。

【0015】本発明の測定方法によって測定される酸化的DNA損傷産物とは、生体内の活性酸素(酸素ラジカル)等によってDNAが損傷を受けた結果、産生され、尿中に排出されたものである。具体的には、酸化的損傷ヌクレオシドおよび酸化的損傷塩基が挙げられる。酸化的損傷ヌクレオシドとして、例えば、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)、2-ヒドロキシデオキシアデノシン(2-OH-dA)、5-ヒドロキシデオキシシチジン(5-OH-dC)、5-ホルミルデオキシウリジン(5-HO-dU)等が挙げられる。酸化的損傷塩基としては、酸化的損傷ヌクレオシドの塩基部分が挙げられ、具体的には、例えば、8-ヒドロキシグアニン(8-OH-Gua)等が挙げられる。実施例にて示されるように、本発明方法において、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)と8-ヒドロキシグアニン(8-OH-Gua)のような酸化的損傷ヌクレオシドおよび酸化的損傷塩基を同時に測定することができる。

【0016】本発明の測定方法によって測定される発癌物質-DNA付加体(アダクト)とは、ベンツピレン等の発癌物質がDNAに付加され、尿中に排出されたものである。具体的には、ベンツピレン-dG付加体等が挙げられる。

【0017】本発明の測定方法の第1工程は、逆相カラムおよびイオン交換カラムの特性を併せ持つゲルろ過カラムに尿を通して分画し、酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体を含む画分を得る工程である。逆相カラムおよびイオン交換カラムの特性を併せ持つゲルろ過カラム(以下、マルチモードカラムともいう)とは、分離モードとして、逆相モード、イオン交換モードおよびゲルろ過モードが同時に作用し、分離が行われるカラムをいう。

【0018】本マルチモードカラムの逆相モードは、充填剤としてポリビニルアルコールを用いることによって作用する。また、イオン交換モードを作用させるために、本マルチモードカラムの充填剤固相には、カルボキシル基が含まれている。ゲルろ過モードを作用させるためには、ポアサイズとして、約50Å〜約1000Åの範囲が挙げられ、排除限界分子量として、約500〜約40000の範囲が挙げられる。充填剤の粒子径として、約2μm〜約50μmの範囲が挙げられる。

【0019】本マルチモードカラムの具体例として、Shodex<sup>TM</sup> Asahipak<sup>TM</sup> GS-320 HQ(昭光通商社)やShodex<sup>TM</sup> Asahipak<sup>TM</sup> GS-320 7G(昭光通商社)が挙げられる。これらのカラムには、充填剤としてポリビニルアルコールが用いられており、カルボキシル基が含まれている。また、これらのカラムの排除限界分子量は、約

40000である。溶離液としては、pHが約2～約12の水溶液が可能であるが、8-OH-dGの分析のためには0.1%酢酸溶液が最も適している。本マルチモードカラムを用いることによって、尿中の塩分、タンパク質、低分子不純物をほとんど一度に除去できる。

【0020】本発明の測定方法の第2工程は、第1工程で得られた、酸化了的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体を含む画分を逆相カラムに通す工程である。逆相カラムとしては、例えば8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)の分析に用いる標準的なものを用いることができる。具体的には、例えば、YMC-Pack ODS-AM(S-5 $\mu$ m)(YMC社)等が挙げられる。

【0021】本発明の測定方法の第3工程では、第2工程の逆相カラムからの溶離液中の酸化了的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の量が、電気化学検出器(ECD)または液体クロマトグラフィー質量分析装置(LCMS)等を用いて測定される。

【0022】検出系の概念図を図1に示した。マルチモードカラム(図1中のHPLC-1)及び逆相カラム(図1中のHPLC-2)の2本のカラムをオートサンプリングインジェクターを介して接続し、HPLC-1で得られた分画が自動的に攪拌され、その一定量がHPLC-2に注入されるようにする。この際、カラムの温度は25 $^{\circ}$ Cになるように設定するのが好ましい。HPLC-2から溶出される溶液は、例えば、ECDにより直接解析される。

【0023】具体的には、例えば東ソー社HPLC装置のように脱気装置(SD-8022)を内蔵したポンプ1(CCPM-I I)に0.5 ml相当の尿をオートサンプラー(日本分光社のAS-950-10)によりHPLC-1に注入する。用いるカラムとしては例えば、Asahipak<sup>T M</sup> GS-320 7G(7.6x300mm)(昭光通商社)または機能的に同じカラムであり同様の分離パターンを示すAsahipak<sup>T M</sup> GS-320 HQ(7.6x300mm)(昭光通商社)を使用することができる。溶離液は、ポンプ2によりサンプリングインジェクターに送り込まれる。サンプリングインジェクターとしては、例えばエイコム社のオートサンプリングインジェクターM231XLを用いることができる。この際、UV検出器(290nm)で分離パターンを確認する。分取範囲は、カラム毎に測定対象の標準試料を用いて決定する。分取範囲が決定された場合、サンプリングインジェクターにより自動分取(約10ml)を行い、自動攪拌後、100 $\mu$ lをHPLC-2に注入するように設定する。次に、HPLC-2によって更に分画を行い、例えばECDで分析する。また、自動運転によって連続的に尿試料を分析する場合は、165分毎にオートサンプラーを用いて尿を注入すればよく、尿の分画後にHPLC-1カラムは100%メタノールで洗浄するように設定すればよい。また、HPLC-2カラムは洗浄することなく繰り返し用いることができる。

【0024】本発明の測定方法の特徴は、HPLC-1の分離パターンから目的の成分が含まれる分画を標準試料を用

いて予め定め、HPLC-2の溶出条件を適切にコントロールすることによって、8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)を含む種々の酸化了的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体の測定を行うことが可能であることである。例えば、5-ヒドロキシデオキシシチジン(5-OH-dC)やその塩基である5-ヒドロキシシトシンは、ECDを用いて分析ができる。この酸化了的DNA損傷の一種、5-OH-dCは突然変異誘発能があり発癌とも関係すると思われるが、ECDにより検出されることが判っており、本方法で尿から検出することが可能である。また、ECDでは検出されないが、代わりに近年進歩の著しい液体クロマトグラフィー質量分析装置(LCMS)を用いることにより、例えば2-OH-dAや5-CHO-dUを含む様々な酸化了的損傷ヌクレオチドを測定できる。ヌクレオチドプール中の2-OH-dATPは8-OH-dGTPよりも変異誘発能が強く、また生成量も多いと考えられているので、人尿中の2-OH-dAの測定は発癌予測、健康指標として有用性が高いと考えられる。その他、20種類程の酸化了的DNA損傷産物が存在すると考えられており、それらの測定にも本発明方法を適用することが可能である。また、発癌物質がDNAに付加した成分の解析にも応用が可能である。例えば、ベンツピレン-dG付加体等が挙げられ、発癌予測に用いることが可能であり、有用性が高い。

【0025】また、修復酵素の欠失した患者の場合、正常な機能を有する場合に比べ、発癌リスクが非常に高いことが考えられる。本発明の測定方法の利用により、例えば8-OH-dGと8-OH-Guaとの存在量の比率を検討することによって修復酵素活性の欠失または低下した疾患、例えば家族性高発癌疾患の診断に用いることができる。

【0026】

【実施例】以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなら限定されるものではない。

【0027】実施例1

マルチモードカラムによる尿の分離

マルチモードカラム(Asahipak<sup>T M</sup> GS-320 7G; 7.6x500mm)による尿の分離を実施した。尿は1.0mlずつチューブに分注して凍結保存した。分析に際し、解凍した尿1.0mlに0.5mlの純水を加え、更に45 $\mu$ lの酢酸を加え良く攪拌した。15000回転で5分間遠心後、上清の0.75mlをオートサンプラーによりマルチモードカラムに注入した。溶離液は、0.1%酢酸で行い、カラム温度は25 $^{\circ}$ Cとした。また、流速は1.0ml/minで行った。図2に分離例を示した。本例で用いたカラムの場合、8-OH-dGと8-OH-Guaの標準試料の溶出分画を検討した結果、51～60分の方画を分取すればよいことが判明した。マルチモードカラムとして、Asahipak<sup>T M</sup> GS-3207G(7.6x500mm)のかわりにAsahipak<sup>T M</sup> GS-320 HQ(7.6x300mm)を用いても同様の分離パターンが得られた。

【0028】実施例2

## 逆相カラムによる標準試料の分離

逆相カラム (YMC-pack ODS-AM, S-5 $\mu$ m; 4.6x250mm) による標準試料の分離を実施した。8-OH-dGと8-OH-Guaの標準試料を逆相カラムに注入した。溶離液は1リットルあたり、45ml 1N NaOH、10ml 1N酢酸、25ml 1N酢酸ナトリウム、12.5ml 1Nクエン酸、50ml メタノールを含む溶液 (pH7.25) とした。カラム温度を25℃に設定し、流速0.8ml/mlで溶離させた。8-OH-dGと8-OH-Guaの検出は、クーロケム社のESA CoulochemIIで行った。検出条件は、ガードセルを350mV、E1を100mV、E2を300mVの検出信号で行った。測定した結果を図3に示した。8-OH-dGと8-OH-Guaのピーク位置は大きく離れ、両成分ともバックグラウンドの低い測定ができることが明らかとなった。

## 【0029】実施例3

## 逆相カラムによる尿分画の分離

実施例2と同様のカラムの分離条件と測定条件を用いて実施例1で分取した尿の51~60分の分画 (10ml) の内、100 $\mu$ lを逆相カラムにかけた。その結果を図4に示した。図3と同様に8-OH-dGと8-OH-Guaは単一の成分として分離された。特に、8-OH-dGのピークはバックグラウンドが低く、近傍に夾雑物が検出されない良好なものであった。図中に8-OH-dGの溶離パターンをUVレンジを換えたものを示した。

## 【0030】

【発明の効果】本発明により、活性酸素の発生の指標としてこれまで測定されてきた8-OH-dGのような酸化的損

傷ヌクレオシドの尿中濃度を高感度且つ簡便に測定することが可能となった。また、酸化的損傷ヌクレオシドおよびその修復産物である酸化的損傷塩基、例えば8-OH-Guaと8-OH-dGとを同時に測定することにより、生体が実際にどの程度の活性酸素に曝されているかを正確に把握するばかりでなく、修復酵素活性の欠失または低下した疾患を調べることも可能となった。更には、発癌物質-DNA付加体 (アダクト) の測定を可能にする技術が確立され、今後の発癌予防対策に大きく貢献しうる。

## 【図面の簡単な説明】

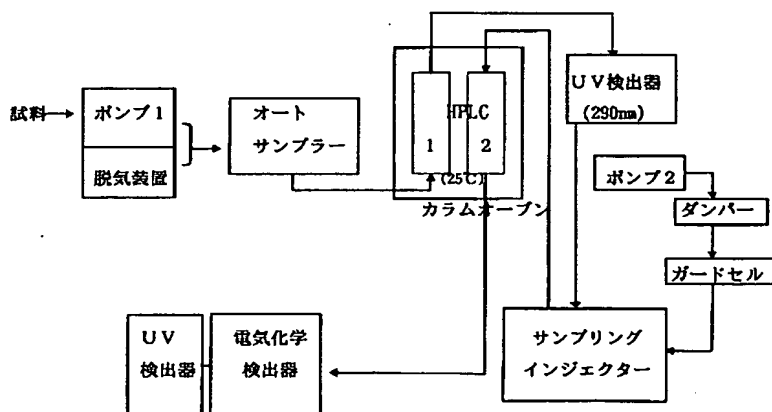
【図1】図1は、尿中の酸化的DNA損傷産物または発癌物質-DNA付加体を測定するための、分析機器の接続の概略図である。

【図2】図2は、マルチモードカラムAsahipak<sup>TM</sup> GS-320 7G (7.6x500mm)を用いて尿を分画した場合の分離例を示したものである。逆相カラムに注入した51-60分の分画を図中に示した。

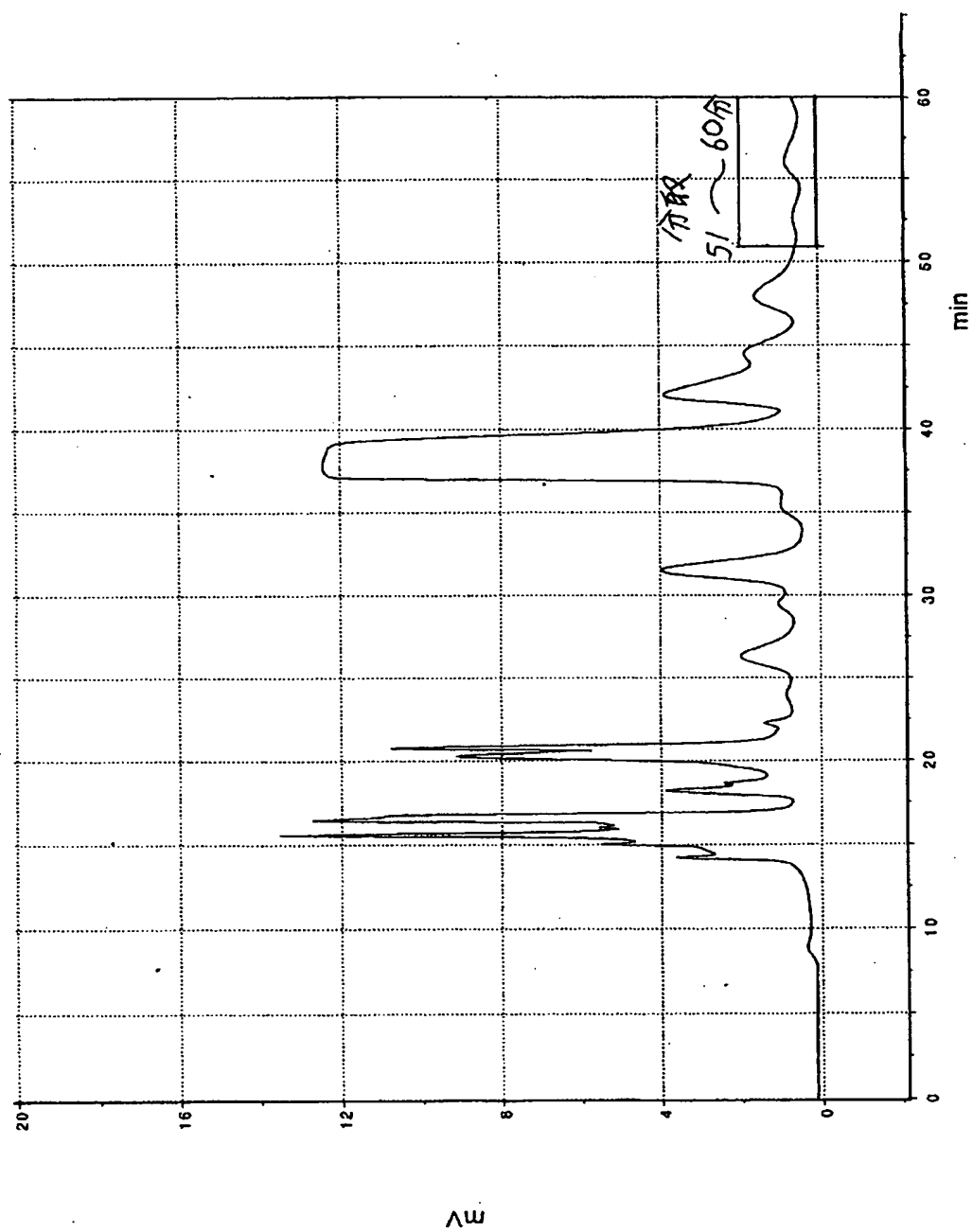
【図3】図3は、逆相カラムYMC-Pack ODS-AM (S-5 $\mu$ , 4.6x250mm)を用いた8-OH-dG及び8-OH-Guaを標準試料として分析した時の分離例である。ピーク1は8-OH-Guaを、ピーク2は8-OH-dGである。

【図4】図4は、マルチモードカラムを通した際の51-60分の分画を集め、その内100 $\mu$ lを逆相カラムで分析した時の分離例である。ピーク1は8-OH-Guaを、ピーク2は8-OH-dGである。図中にUVレンジを2倍に換えたときのピーク2を示した (x2)。

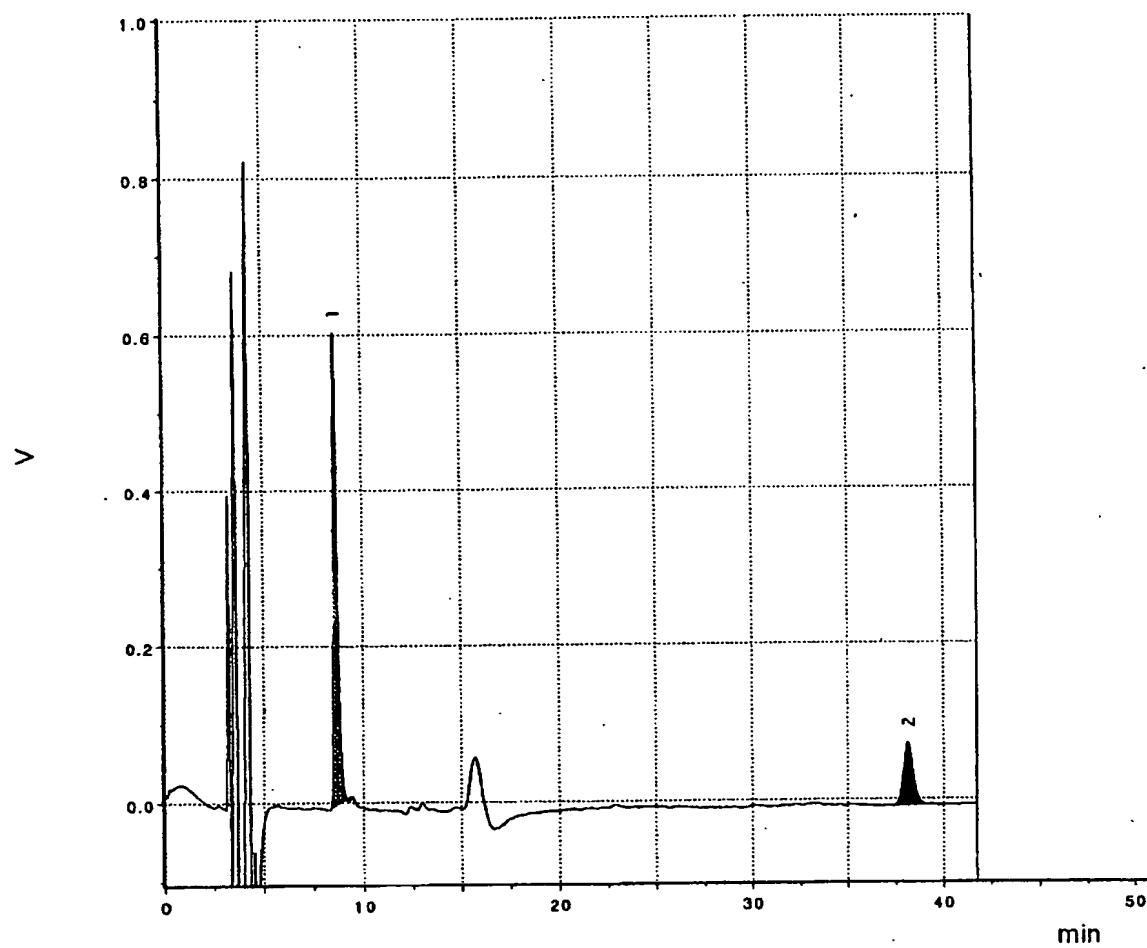
【図1】



【図 2】

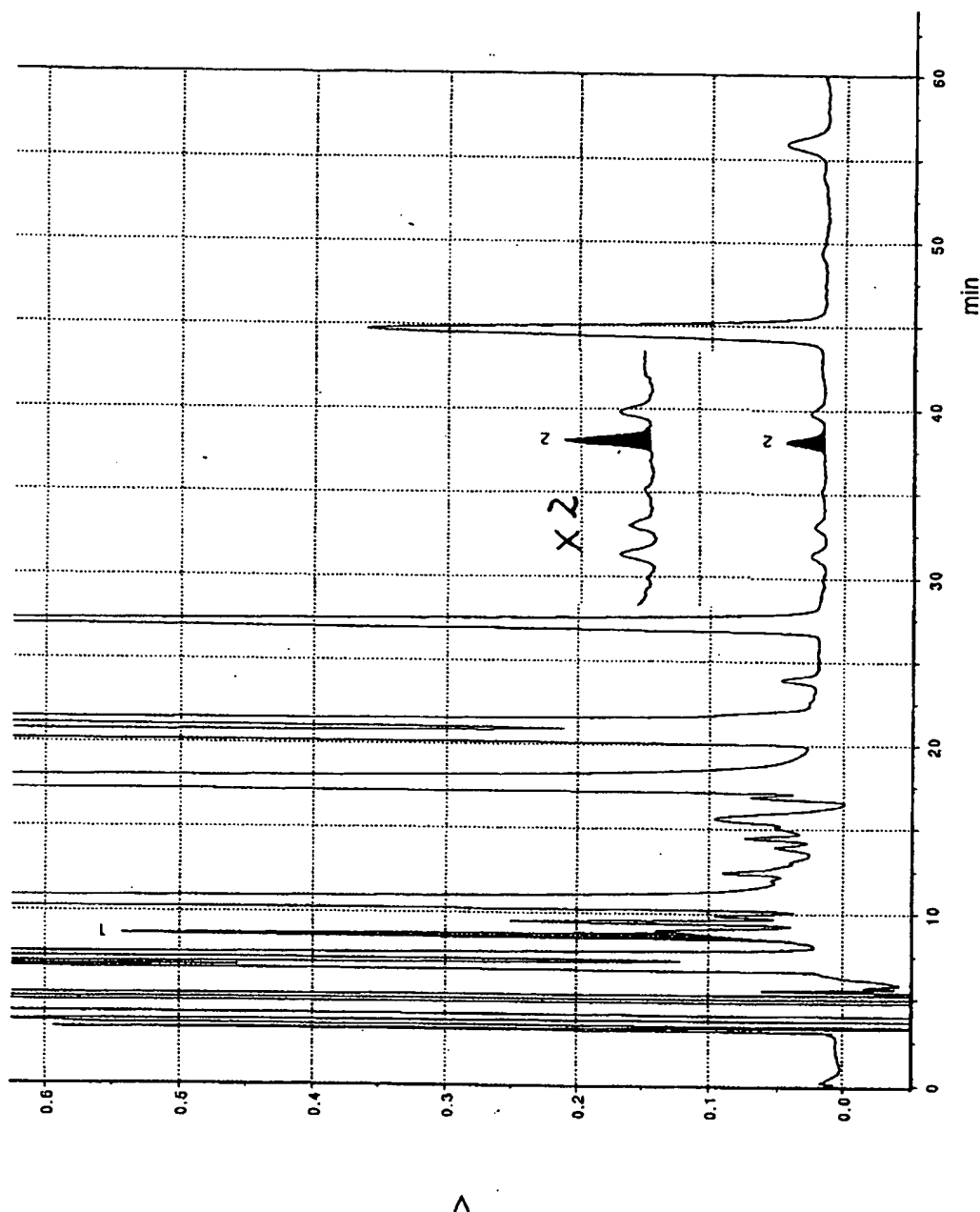


【図 3】





【図 4】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

テーマコード (参考)

G 0 1 N 30/48  
 30/80  
 33/493  
 33/50

G 0 1 N 30/48  
 30/80  
 33/493  
 33/50

G  
 F  
 A  
 P